

DNA MARKER LOCATING NEAR MALE STERILITY RESTORATION GENE IN RICE CYTOPLASM AND DNA DIAGNOSIS

Patent number: JP9313187
Publication date: 1997-12-09
Inventor: AKAGI HIROMORI; INAGAKI AKIKO; YOKOZEKI
SUKEYOSHI; NAKAMURA ATSUSHI; FUJIMURA
TATSUTO
Applicant: MITSUI PETROCHEM IND LTD
Classification:
- **international:** C12N15/09; C07H21/04; C12Q1/68
- **european:**
Application number: JP19960136502 19960530
Priority number(s):

Abstract of JP9313187

PROBLEM TO BE SOLVED: To simply and exactly judge the fertility restoration plasma of rice plants by confirming whether there is the codominant DNA marker for fertility restoration gene or not through the PCR technique using the rice plant DNA as a template and a primer and by identifying the gene type.

SOLUTION: This invention relates to a method for discriminating the fertility restoration plasma of rice plants in which the rice plant DNA is used as a template and the codominant DNA marker within 4.7 centimorgan near the fertility restoration gene in the rice gene is specifically amplified by the PCR technique using rice plant DNA as a template and a primer to judge whether the codominant DNA marker is present or absent. In addition, the length of its DNA fragment is detected on the difference between the case of 409 bp and the case of 425 bp whereby the fertility restoration gene are discriminated into three types. Thus, the growth of hybrid rices and their parent lines can be done with labor saved and enables the purity control of the seeds of hybrid rice by this gene plasma judgment.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-313187

(43) 公開日 平成9年(1997)12月9日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A
// A 0 1 H 1/00			A 0 1 H 1/00	Z

審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平8-136502	(71) 出願人	000003126 三井東圧化学株式会社 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号
(22) 出願日	平成8年(1996)5月30日	(72) 発明者	赤木 宏守 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学株式会社内
		(72) 発明者	稲垣 明子 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学株式会社内
		(72) 発明者	横関 祐美 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 イネの細胞質雄性不稔回復遺伝子の近傍に位置するDNAマーカーおよびDNA診断法

(57) 【要約】

【課題】 イネの稔性回復遺伝子の遺伝子型を識別でき、稔性回復の能力の有無を簡便かつ確実に検定する方法を提供する。

【解決手段】 イネの稔性回復遺伝子近傍に位置するDNA配列を特定し、その中の単純繰り返し配列をPCRで特異的に増幅させ、増幅DNA断片の長さの違いを検出することによって、稔性回復遺伝子に関する3種類の遺伝子型を識別し、稔性回復能力の有無を判別する。

【効果】 DNAレベルで稔性回復遺伝子の遺伝子型が識別でき、稔性回復能力を判別できるので、ハイブリッドライスおよびその親系統の育成を省力化できると共に、ハイブリッドライス種子の純度管理が可能になった。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 イネの稔性回復形質を判別する方法であって、以下の工程よりなる方法。

- a) イネのDNAを鋳型とし、プライマーを用いたPCR法により、該イネ遺伝子中の稔性回復遺伝子の共優性のDNAマーカーの有無を確認し、
- b) a)の結果より該イネの稔性回復遺伝子の遺伝子型を識別し、
- c) よって、該イネの稔性回復形質を判別する。

【請求項2】 該共優性のDNAマーカーがイネの稔性回復遺伝子の近傍4.7センチモルガン以内に位置するものであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 共優性のDNAマーカーが409bpの長さを有することを特徴とする請求項1或いは2に記載の方法。

【請求項4】 共優性のDNAマーカーが配列表の配列番号2に記載のDNA配列を有することを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】 共優性のDNAマーカーが425bpの長さを有することを特徴とする請求項1或いは2に記載の方法。

【請求項6】 共優性のDNAマーカーが配列表の配列番号3に記載のDNA配列を有することを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項7】 共優性のDNAマーカーの有無の確認を、GATGの4塩基のヌクレオチド単位の繰り返しよりなるマイクロサテライトの長さに基づいて行うことを特徴とする請求項3～6の何れか一項に記載の方法。

【請求項8】 プライマーが配列番号2の1番～232番及び配列番号2の409番～232番より任意に選ばれる、プライマーとして必要な連続した任意の長さのオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項1～4又は請求項7の何れか一項に記載の方法。

【請求項9】 プライマーが配列番号3の1番～232番及び配列番号3の409番～238番より任意に選ばれる、プライマーとして必要な連続した任意の長さのオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項1、2、5～7の何れか一項に記載の方法。

【請求項10】 プライマー15～30塩基のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項8又は9に記載の方法。

【請求項11】 b)の工程において、イネの稔性回復遺伝子の遺伝子型を識別するに際して、a)の工程の結果と共に、下記のd)の工程の結果を考慮することを特徴とする、請求項8又は10に記載の方法。

d) イネのDNAを鋳型とし、プライマーを用いたPCR法により、該イネ遺伝子中の稔性回復遺伝子の共優性のDNAマーカーfL601の有無を確認する。

【請求項12】 d)の工程において使用されるプライマーが配列表の配列番号7及び8に記載のDNAである

ことを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】 イネ稔性回復遺伝子から4.7センチモルガン以内に位置するイネ稔性回復遺伝子の共優性のDNAマーカー。

【請求項14】 共優性のDNAマーカーが409bpの長さを有することを特徴とする請求項13に記載のDNAマーカー。

【請求項15】 共優性のDNAマーカーが配列表の配列番号2に記載のDNA配列を有することを特徴とする請求項14に記載のDNAマーカー。

【請求項16】 共優性のDNAマーカーが425bpの長さを有することを特徴とする請求項13に記載のDNAマーカー。

【請求項17】 共優性のDNAマーカーが配列表の配列番号3に記載のDNA配列を有することを特徴とする請求項16に記載のDNAマーカー。

【請求項18】 配列表の配列番号4の配列を有するDNAプライマー。

【請求項19】 配列表の配列番号5の配列を有するDNAプライマー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、イネ、特にハイブリッドライスおよびその親系統の育成または育成されたハイブリッドライス種子生産における種子純度および親系統の純度の管理に利用される稔性回復形質の判別に関し、更に詳しくは該判別に使用されるDNAマーカーに関する。

【0002】

【従来の技術】細胞質雄性不稔(CMS)は農業上極めて重要な形質の一つでハイブリッド種子の生産に利用される。CMSは高等植物に広く見られる現象で、核と細胞質の遺伝子産物の不親和によって正常な花粉が生産できなくなる現象である。核にコードされる稔性回復遺伝子は、CMS細胞質による花粉の不稔性を打ち消す機能を持つ。従って、稔性回復遺伝子を持つハイブリッド植物は可稔となるため、ハイブリッド植物にとっては核にコードされる稔性回復遺伝子が必須となる。イネにおいても、野生種に栽培種を交配したり、インディカ種にジャポニカ種を交配した場合に、核と細胞質の不親和によってCMSが生じることが知られている。さらに、これらのCMSを回復する稔性回復遺伝子も幾つか同定されている。ハイブリッドライスを商業生産する方法として、上記の細胞質雄性不稔と稔性回復遺伝子を組み合わせた「三系法」が確立されている。「三系法」とは細胞質雄性不稔細胞質を持つ細胞質雄性不稔系統とこれを維持するための維持系統およびハイブリッドライスで稔性を回復させるための稔性回復遺伝子を有する稔性回復系統を用いてハイブリッドライスを大規模生産する方法である。稔性回復系統にとって必須となるのが稔性回復遺

伝子の有無である。従来、この稔性回復遺伝子の有無を判別するためには、まず、調査対象とする系統を雄性不稔系統と交配し、次に、得られた交配種子を播種して植物体を育成し、その植物の自殖種子の形成率を調査する必要があった。すなわち、この自殖種子の形成率が80%以上の場合に、稔性回復遺伝子を有すると判別していた。しかし、かかる方法では膨大な労力と時間を必要とするため、簡便でかつ確実に稔性回復遺伝子の有無、さらには、稔性回復形質の有無の判別方法の開発が望まれていた。

【0003】本発明では、優性の稔性回復遺伝子の遺伝子型を $Rf-1$ で示し、稔性回復遺伝子を持たない劣性の遺伝子型を $rf-1$ で示す。従って、稔性回復遺伝子を持つイネの遺伝子型は $Rf-1/Rf-1$ の優性ホモ型、これを持たないイネの遺伝子型は $rf-1/rf-1$ の劣性ホモ型、これらのハイブリッド(F1)の遺伝子型は $Rf-1/rf-1$ のヘテロ型で示される。

【0004】近年、DNA解析技術の急速な進歩によって、DNAレベルで目的遺伝子または目的形質を判別することが可能となってきた。しかし、そのためには、目的遺伝子そのものもしくは目的遺伝子と極めて近接して存在する塩基配列(DNAマーカー)が必要であった。現在のところ上記の稔性回復遺伝子の機能・構造は不明で、これを直接同定する方法は存在しない。間接的に稔性回復遺伝子の存在を同定する方法に関しては、これまでにRandom Amplified Polymorphic DNA(RAPD)法によって見出されたDNAマーカーが1個存在している(特開平06-016162)。このマーカーは稔性回復系統にのみ存在し、稔性回復遺伝子を持たない系統には存在しない。すなわち、このマーカーは優性のマーカーで、 $Rf-1$ を持つ場合には有性のホモでもヘテロでも検出され、これを持たない場合($rf-1$)には検出されない。従って、稔性回復遺伝子に関して優性ホモ型($Rf-1/Rf-1$)とヘテロ型($Rf-1/rf-1$)では検出され、劣性ホモ型($rf-1/rf-1$)では検出されない。このため、この様な優性マーカーでは優性ホモ型とヘテロ型の遺伝子型を識別することができなかった。また、ある遺伝子の有無を間接的に近傍のDNAマーカーを利用して判別する場合に、遺伝子本体との距離によって誤差が生じるため、DNAマーカーが目的遺伝子に限りなく近い程、精度が高く効果がある。さらに、目的遺伝子に対して反対側に位置するDNAマーカーと組み合わせることによって、DNA診断の精度は飛躍的に向上する。これは、染色体の組換えに於いて二重組換えの生じる確率に比例するからである。

【0005】ある特定の遺伝形質をDNAを用いて判別するためには、対象とする遺伝形質を支配する遺伝子またはその近傍にあるDNAを特定する必要がある。この様なDNAを特定する方法として、ゲノム構造を解析す

るための様々なフィンガープリント法が開発されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、イネの稔性回復遺伝子の優性ホモ型、劣性ホモ型、ヘテロ型の3種類の遺伝子型を識別でき、イネの稔性回復の能力の有無を簡便かつ確実に判別する方法を提供することにある。

【0007】

10 【課題を解決するための手段】本発明者らは、2～数塩基の短いヌクレオチドの単位の繰り返し配列よりなるマイクロサテライトに着目し、これを利用してイネの稔性回復遺伝子の共優性のDNAマーカーを見出すことに成功した。そして、PCR法によって共優性のDNAマーカーを増幅しその存在を確認することによって、イネの稔性回復遺伝子の優性ホモ型、劣性ホモ型、ヘテロ型の3種類の遺伝子型が識別でき、これによりイネの稔性回復形質を判別することが可能であることを見だし、本発明を完成した。

20 【0008】即ち、本発明は、以下の工程よりなるイネの稔性回復形質を判別する方法、該方法に使用される共優性のDNAマーカー及びプライマーを提供するものである。

a) イネのDNAを鋳型とし、プライマーを用いたPCR法により、該イネ遺伝子中の稔性回復遺伝子の共優性のDNAマーカーの有無を確認し、

b) a)の結果より該イネの稔性回復遺伝子の遺伝子型を識別し、

c) よって、該イネの稔性回復形質を判別する。

30 【0009】

【発明の実施の形態】本発明で言うイネの稔性回復遺伝子の共優性のDNAマーカーとは、イネの稔性回復遺伝子の近傍に位置するDNAであり、イネ細胞中の該DNAの存在を調べることにより間接的に該稔性回復遺伝子の有無が判別できるものを指す。

【0010】本発明のイネの稔性回復遺伝子の共優性のDNAマーカーとしては、例えば配列番号2或いは配列番号3に記載の塩基配列を有するDNAが挙げられる。

40 【0011】共優性のDNAマーカーによる稔性回復遺伝子の有無を判別する精度は稔性回復遺伝子と共優性のDNAマーカーとの距離によって決定される。これらのDNAは稔性回復遺伝子の極近傍に位置するため、そのDNAの有無を調べることでイネの稔性回復形質を高い精度で判別することができる。例えば、本発明者らによる稔性回復遺伝子をホモに持つイネと持たないイネを交配して得られた後代の稔性回復形質の解析の結果、稔性回復遺伝子と本発明の共優性のDNAマーカーとの遺伝的距離は約3.7cM(センチモルガン)と決定された。これらの結果は、組み換え世代である交配後代から96%以上の精度で稔性回復遺伝子の有無を判別できる

ことを意味している。

【0012】イネの稔性回復遺伝子のDNAマーカーの同定方法について以下に説明する。稔性回復遺伝子の遺伝子型が異なるイネ（優性ホモ型と劣性ホモ型）から抽出されたDNAを鋳型としたPCR法によりそれぞれのイネのゲノム構造を比較分析する。即ち、PCR用のプライマーとして配列番号1に示したAGの繰り返し配列を有するオリゴヌクレオチドを用い、稔性回復遺伝子の遺伝子型が異なるイネから抽出されたDNAを鋳型としてDNA断片を増幅する。増幅されたDNA断片の分子サイズを電気泳動法でにより確認し、稔性回復遺伝子の1種の遺伝子型に特異的に存在するDNA断片（稔性回復遺伝子のDNAマーカー）を選抜する。この場合、1種類のプライマーで異なるサイズに増幅された稔性回復遺伝子のDNAマーカーが選抜できる。この様にPCR法による検査において単一のプライマーを用いて遺伝子型を識別できるDNAマーカーを特に共優性のDNAマーカーと呼び、特開平06-016162で得られた優性のDNAマーカーのごときPCRプライマーと各遺伝子型に特異的なDNAマーカーが1対1に対応するDNAマーカーとは区別される。上記のそれぞれの遺伝子型に対応して増幅されたDNA断片（稔性回復遺伝子の共優性のDNAマーカー）の塩基配列を調べたところ、それぞれ配列番号2或いは配列番号3に記載の塩基配列であった。これら共優性のDNAマーカーは互いによく似た塩基配列を有し、これら共優性のDNAマーカーには、共にGATGの4塩基のヌクレオチドを単位とする繰り返し配列（マイクロサテライト）が見出された（配列番号2の配列の第224番～第239番及び配列番号の第224番～第255番）。この配列番号2または配列番号3の繰り返し配列をPCRによって増幅することによってその長さの違いを明らかにすることが出来る。この目的のためには対照とするマイクロサテライトを挟み、向い合う2種類のプライマーが必要となる。これらのプライマーとして、配列番号2または配列番号3のマイクロサテライト両側の塩基配列を基に合成したオリゴヌクレオチドを用いることが出来る。一般に、PCRプライマーとしては15ないし30bpのオリゴヌクレオチドが利用される。合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いることによって、上記マイクロサテライトをPCR法により特異的に増幅させることが出来る。増幅されたマイクロサテライトはイネの稔性回復遺伝子の遺伝子型に対応してGATGの4塩基のヌクレオチド単位の繰り返しの数が異なるため、増幅されたマイクロサテライトを含む稔性回復遺伝子の共優性のDNAマーカーの長さによって稔性回復遺伝子の遺伝子型を識別することができる。よって、この方法で1対のプライマーを用いれば3種類の遺伝子型が識別できることになり、イネの稔性回復遺伝子に関して優性ホモ、劣性ホモ、ヘテロの雑種第1代（Rf-1/rf-1）の形質

を判別することができる。

【0013】さらに、稔性回復遺伝子を挟んで本発明で得られた共優性のDNAマーカーとは逆側に位置するDNAマーカー、例えば、配列番号6に示すDNAマーカー等と組み合わせることによって、飛躍的に稔性回復遺伝子を有するイネを判別する精度が向上できることを見出した。すなわち、本発明で見出された共優性のDNAマーカーによって稔性回復形質を有すると判別された植物体について、配列番号6に示すDNAマーカーの有無を調べる。DNAマーカーの有無を調べる方法としては配列番号6に特異的なプライマーを用いて、PCRによるDNA断片の増幅の有無によって調べることが出来る。プライマーとしては、配列番号6の塩基配列に基づき、お互いに向い合う15～30bpの2種類のオリゴヌクレオチドを組み合わせ用いる。DNAマーカーを持つ場合には稔性回復形質を有し、DNAマーカーを持たない場合には稔性回復形質を有しないと判定する。

【0014】本発明の稔性回復遺伝子の共優性のDNAマーカーを用いる、イネの稔性回復遺伝子の遺伝子型の識別方法および稔性回復能力の有無の判別方法は以下のとおりである。

【0015】すなわち、イネ植物体またはイネ種子よりDNAを抽出する。DNAの抽出方法としてはどのような方法も用いることができ、粗精製のDNAを用いることもできる。抽出されたDNAを鋳型として共優性のDNAマーカーをPCR法によって増幅する。増幅された異なる2種類の分子サイズの共優性のDNAマーカー断片の電気泳動パターンから、鋳型としたDNAを抽出したイネの稔性回復遺伝子の優性ホモ型（Rf-1/Rf-1）および劣性ホモ型（rf-1/rf-1）とヘテロ型（Rf-1/rf-1）の遺伝子型を識別し、表現形質を判別する。すなわち、Rf-1をホモに持つイネからは345bpのDNA断片のみが、一方、rf-1をホモに持つイネからは329bpのDNA断片のみが増幅される。また、Rf-1とrf-1を併せ持つヘテロ型のイネからは2種類のDNA断片が同時に増幅される。これらDNA断片の有無を確認することによってイネの稔性回復遺伝子の遺伝子型が識別できる。

【0016】

【実施例】以下に本発明を実施例に基づき詳細に説明する。

【0017】[実施例1] イネのRf-1の準同質遺伝子系統として、MTC-10A、MTC-10RおよびMTC-10AにMTC-10Rを交配して得たF1の3種を用いた。MTC-10AとMTC-10Rは、共にChinsurah Boro IIに台中65号を戻し交配して得た系統である。MTC-10Rは稔性回復遺伝子をホモに持つ稔性回復系統であり、MTC-10Aは稔性回復遺伝子を持たない細胞質雄性不稔系統である。従って、MTC-10Aの遺伝子型はrf-1/

r f - 1、MTC - 10 Rの遺伝子型はR f - 1 / R f - 1、F 1の遺伝子型はR f - 1 / r f - 1である。MTC - 10 A、MTC - 10 RおよびF 1の植物体の葉よりDNAをCTAB法(Lichenstein & Draper 1985)によって抽出した。

【0018】PCRはGeneAmp9600システム(ABI社)を使用し、20μlの反応量で行った。反応液20μl中には10ng DNA、0.5unit s TAKARA Taq (TAKARA社)、4nmole dNTP、10pmole primer、10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂が含まれる。PCR条件は、95℃で10秒間のディネーチャー、52℃で30秒間のアニール、72℃で30秒間の伸長反応を1サイクルとし、45サイクル反応させた。反応後、2.5% MetaPhor Agarose (FMC社)で分画した。配列番号1の塩基配列を有するDNAをプライマーとして用いた場合に、MTC - 10 A、MTC - 10 Rともに複数のDNA断片が増幅された。これらのDNA断片の中にMTC - 10 AとMTC - 10 R間で明確な多型を示すDNA断片が見出された。すなわち、R f - 1をホモに持つMTC - 10 Rでは約420bpのDNA断片が、一方、r f - 1をホモに持つMTC - 10 Aでは約400bpのDNA断片が増幅された。

【0019】[実施例2] 実施例1で得られたMTC - 10 AおよびMTC - 10 R由来のそれぞれ約400bpおよび約420bpのDNA断片を電気泳動後回収し、TAクローニングキット(In Vitrogen社)を用いてプラスミドpCRTM11にサブクローニングした。その結果、MTC - 10 AおよびMTC - 10 R由来のDNA断片を含むクローン、pRf835AおよびpRf835Rを得た。pRf835AおよびpRf835Rの塩基配列は373S DNAシーケンサー(ABI社)を用いて決定した。DNA断片の塩基配列は、MTC - 10 A由来のものが配列番号2ののとおり409bpのものであり、MTC - 10 R由来のものが配列番号3に記載の421bpのものであった。両DNA断片の塩基配列は極めて相溶性が高く、これらのクローンが同じ領域に由来することが明らかとなった。両DNA断片の塩基配列で2塩基で塩基置換が生じていた。両者のDNA鎖長の違いは、該DNA断片に含まれるGATGの4bpよりなるヌクレオチド単位の繰り返し数の違いであることが明らかとなった。すなわち、MTC - 10 AではGATGのヌクレオチド単位が4回繰り返されているのに対し、MTC - 10 Rでは該単位が8回繰り返されていることが相違する。

【0020】実施例1で用いたプライマーでは目的とする多型バンドに加えて複数のバンドが増幅されてくる。そのため、遺伝子型の識別にはやや不都合である。より明確に遺伝子型を識別するため、配列番号2又は配列番

号3に記載のDNA配列のみを特異的に増幅するための4bpのリビートを挟むPCRプライマーpRf1(配列番号4)とpRf2(配列番号5)を設計した。これらのPCRプライマーpRf1及びpRf2を用いてGeneAmp9600システム(ABI社)を使用し、実施例1の3種類の遺伝子型の植物体から抽出したDNAを鋳型としてPCRを行った。反応液20μl中には10ng DNA、0.5unit s TAKARA Taq (TAKARA社)、4nmole dNTP、10pmole プライマー(pRf1)、10pmole プライマー(pRf2)、10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂が含まれる。PCR条件は、95℃で10秒間のディネーチャー、60℃で30秒間のアニール、72℃で30秒間伸長反応を1サイクルとし、35サイクル反応させた。反応後、2.5% MetaPhor Agarose (FMC社)で分画した。

【0021】実験の結果、MTC - 10 AのDNAを鋳型とした場合には329bp、MTC - 10 RのDNAを鋳型とした場合には345bpのDNA断片が、また、F 1のDNAを鋳型とした場合には329bpと345bpのDNA断片が増幅された。すなわち、このDNAマーカーによってR f - 1に関する優性ホモ型(R f - 1 / R f - 1)、劣性ホモ型(r f - 1 / r f - 1)およびヘテロ型(R f - 1 / r f - 1)の3種類の遺伝子型が識別できることが明らかとなった。

【0022】[実施例3] 実施例2の方法を用いた場合の稔性回復遺伝子の判別の精度を明らかにするため、実施例2で増幅される329bpと345bpのDNA断片と稔性回復遺伝子との遺伝的距離を決定した。実施例1で用いた準同質遺伝子系統のMTC - 10 Aを母親とし、これにMTC - 10 Rを交配してF 1植物を育成した。得られたF 1の花粉をMTC - 10 Aに交配し、322個体のB 1 F 1植物を得た。MTC - 10 AはBT型の細胞質を有する配偶体型細胞質雄性不稔であるので、MTC - 10 A / MTC - 10 RのF 1では稔性回復遺伝子の遺伝子型R f - 1の花粉のみが正常に発達する。すなわち、F 1の花粉をMTC - 10 Aに戻し交配して得られるB 1 F 1の遺伝子型はR f - 1 / r f - 1のヘテロとなり、すべての個体が稔性回復遺伝子を有する。322個体の植物体からSteinerらの方法((1995) Nucleic Acid Resarch 13:2569-2570)に従って、DNAを粗抽出した。配列番号4および配列番号5のプライマーを用いて、実施例2に示す条件でPCRを行い、増幅されたDNAの電気泳動パターンを解析した。322個体については全て、MTC - 10 Aに由来する329bpのバンドが検出された。一方、310個体ではMTC - 10 R由来の345bpのバンドも検出されたが、12個体でMTC - 10 R特異的なバンドは増幅されなかつ

た。即ち、12個体でOSRRfと稔性回復遺伝子との間で組換えが生じたことになる。このことを元に、Kosambiの計算式((1944) Ann Eugen 12:172-175)によって実施例2の329bpと345bpのDNA断片と稔性回復遺伝子との遺伝的な距離を算出したところ、3.7cM±1.1cMであることが明らかとなった。

【0023】[実施例4] 実施例3で用いたB1F1植物から抽出したDNAを用いて、特開平06-016162で見出されたDNAマーカー(fL601: 配列番号6)と実施例2の329bpと345bpのDNA断片との位置関係を調べた。配列番号7および配列番号8のプライマーを用いて、実施例3と同じDNAを鋳型とし、条件でPCRを行った。増幅されたDNAの電気泳動パターンを解析した。322個体中317個体でバンドの増幅が認められたが、5個体ではバンドの増幅が認められなかった。Kosambiの計算式(前出)によってfL601と稔性回復遺伝子との遺伝的距離を計算した結果、1.6cM±0.7cMの距離であることが明らかとなった。さらに、実施例3の結果をあわせて遺伝的距離を計算し位置関係を解析した結果、fL601は実施例2で見出された329bpと345bpのDNA断片と稔性回復遺伝子を挟んで逆側に位置することが明らかとなった。

【0024】[実施例5] 単離した共優性のDNAマーカーと稔性回復の表現型と関連を調べるため、稔性回復に関して表現形質の異なる11品種を用いた。BT型細胞質雄性不稔に対する稔性回復能力を持たない品種として、MTC-10A、あそみのり、キヌヒカリ、コシヒカリ、日本晴、つがるおとめ、つきのひかりの7品種を、また、この稔性回復能力を持つ品種としてChin*

配列:

AGAGAGAGAG AGAGAGYC

【0028】配列番号: 2

配列の長さ: 409

配列の形: 核酸

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA

配列:

AGAGAGAGAG AGAGAGTCAT CAGACAGTGA ATCGAGCAAG CAACGCGAGG ACACGTACTT	60
ACGCACTCCA AATATTAAGG CGATCAGGCG ATCAGCAACT GCACTTTGCA AATTCGCGCG	120
ATGATAGCGT ATGCGTGATC AATTAACGTG TAATTCTTTT ACGTGTTCGC AAAAAAACT	180
AGATTGCATA TGCATGACAC CTACACACGT ACACGGTACA CACGATGGAT GGATGGATGG	240
ATTGGGCGGC TCACCGAACT GGCCTCTCT CGCACGCACG CACGAAGCCA GGCAGCCAGC	300
TAGCATCGAG GACGTACGTC CGAGCCGCGG AACGGATCTC TCCCGTCAG CAAAGGCGTA	360
CGTATCTCGT CGCGGCCGCG AAGACGTCCC GGCCTCTCTC TCTCTCTCT	409

【0029】配列番号: 3

配列の長さ: 425

配列の形: 核酸

*surah Boro 11, 1R42, 桂朝2号, MTC-10Rの4品種を供試した。これらの幼植物より、Edwardsらの方法((1992) Nucl eic Acid Resarch 19:1349)に従ってDNAを粗抽出した。実施例2に示した方法に従って、配列番号4と配列番号5のプライマーを用いてOSRRfを解析した。その結果、稔性回復能力のない7品種では全てMTC-10Aと同じ329bpのDNA断片が、稔性回復能力を持つ4品種ではMTC-10Rと同じ345bpのDNA断片が増幅された。すなわち、この結果から、PCRによって稔性回復遺伝子の遺伝子型を検査することによってイネ品種の稔性回復能力の有無を判別できることが明らかとなった。

【0025】

【発明の効果】本発明により、イネの稔性回復遺伝子の共優性のDNAマーカーが提供される。本発明の共優性のDNAマーカーをPCRによる稔性回復遺伝子の遺伝子型の識別に利用することにより、イネの稔性回復遺伝子の表現形質の判別を簡便にしかも精度よく行うことが出来る。この本発明の方法により稔性回復能力の有無を判別することが可能となり、ハイブリッドライスの親系統の育成が効率化される。さらに、ハイブリッドライス種子の純度管理が可能となる。

【0026】

【配列表】

【0027】配列番号: 1

配列の長さ: 18

配列の形: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

※起源:

生物名: Oryza sativa L.

組織の種類: 緑葉

配列の特徴

特徴を示す記号: genomic DNA

※ 存在位置: 1..409

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

50 配列の種類: DNA

起源:

生物名: *Oryza sativa* L.

組織の種類: 緑葉

* 配列の特徴

特徴を示す記号: genomic DNA

* 存在位置: 1..425

配列:

AGAGAGAGAG AGAGAGTCAT CAGACAGTGA ATCGAGCAAG CAACGCGAGG ACACGTA CTT 60
 ACGCACTCCA AATATTAAGG CGATCAGGCG ATCAGCAACT GCACTTTGCA AATTCGCGCG 120
 ATGATAGCGT ATGCGTGATC AATTAACGTG TAATTCTTTT ACGTGTCGT AAAAATAACT 180
 AGATTGCATA TGCATGACAC CTACACACGT ACACGGTACA CACGATGGAT GGATGGATGG 240
 ATGGATGGAT GGATGGATTG GCGCGCTCAC CGAAGTGGCC TCCTCTCGCA CGCAGCGACG 300
 AAGGCAGGCA GCCAGCTAGC ATCGAGGACG TACGTCCGAG CCGCGGAACG GATCTCTCCC 360
 GTGCAGCAAA GCGGTACGTA TCTGTCGCG GCGGCAAGA CGTCCCGGGC TCTCTCTCTC 420
 TCTCT 425

【0030】配列番号: 4

配列の長さ: 21

配列の形: 核酸

※鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

※

配列:

ACGAGATACC GTACGCCCTT G 21

【0031】配列番号: 5

配列の長さ: 20

配列の形: 核酸

★鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

★20

配列:

AACGCGAGGA CACGTA CTTA 20

【0032】配列番号: 6

配列の長さ: 1137

配列の形: 核酸

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA

☆起源:

生物名: *Oryza sativa* L.

組織の種類: 緑葉

配列の特徴

特徴を示す記号: genomic DNA

☆ 存在位置: 1..1137

配列:

GAGGAAGAG GAGGAAGAAG AAGAGGAAGA AGCTGGTGAC GGTGAAGCTG AGCGACGAGC 60
 TGATGGGATA CCTGCGGACC AAGGAGGTGA TGCCCTACCT CCGCGCGGAG ACGCCTCGCC 120
 CGCTCCCGAT CGATCCGAGC ATCGCGCACA CATGTTTATT GGCCAAGAAC TCAGGCAGGA 180
 AATCGCCGCC CAAGTTCACG AGAACAGAGA ATTTGACGCC TTCTGCTCTT ACCAGTACCG 240
 CACCAAGGGC TACGCGGAGA TCCAGCAGGA GGTCAACGAC GACGACGACG ACGACGGCTA 300
 GAATCTGTAT GGTATGTTTG GGCAGGGATC GATAATGGTT TGGGGTTGGT GGTATGGAGG 360
 AGTAATGCTT ATCTAAATAT TTAGTAGGGT GGCTCTGCTG CTCATTATTT AGGATATAAT 420
 TACCATGGAC AATGGTGTTA TTATGGCCAT ATCTTTGCTA CTCTCTCCGT TCCATAATAT 480
 AAGATACAAC TATTTTTTAG GGGGACCACC TATACATTTG CCGATAAATT TTCTTCTGAA 540
 AATTTGACAG ATGTAATTAT AGTACAATCG TAGTGTAATT AACTGTAAAC TTATATATAA 600
 CTAGTAATAT GCGCGTGCTA AACGCTACCG GGTAATTATG TTTGTCTTTA ATAACATTTA 660
 AAATTTTCATG TTAGCAATTT TTTTCTGTT AGCATAAGGT CGTCAATATA AACTCAAATA 720
 ACAGTATGAT ATGATATAGA TATCTTAATA ATAGTTTCAC CATGTTAAAC AAGATAACAA 780
 TTGTCGATCA TCTTGTTACG TCTTCCTTCA AGATATACAT GGAACAACCTA CTAATTTTGG 840
 CCAATGGCAA CAGTAAATAT TTAGTGAGAC ACAAGTGTTA ATATATAGTC ATGTTATCAG 900
 TCCAGTGCAA ATTGACGCAT CTAGAACACG ATGGTATGGA GAAGATAATC TCACAATATT 960
 ACACCTGAGT AGTGATGACG TGCTGTACAA AAACAAGAGG AAGTTGGTGA GTAACATTCC 1020
 GATTAACAAT TTAGTACCTT CTAATATATA TTTTCGAATT AATTTTGATC ATGCGAACCT 1080
 ACCTTTGCTC ACCAGTCAAG AACGTCTTTA TACACGTATT TCTGGTGCTC TTCCCTC 1137

【0033】配列番号: 7

配列の長さ: 20

配列の形: 核酸

50 鎖の数: 1本鎖

	(8)	特開平 9 - 3 1 3 1 8 7
13		14
トポロジー：直鎖状		
配列：		
TTGACGCCTT CGTCCTCTAC		20
【 0 0 3 4 】配列番号： 8	* 鎖の数： 1 本鎖	
配列の長さ： 2 0	トポロジー：直鎖状	
配列の形：核酸	*	
配列：		
AGACGTAACA AGATGATCGA		20

フロントページの続き

(72)発明者 中村 淳
千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学
株式会社内

(72)発明者 藤村 達人
千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学
株式会社内